ChinaXiv合作期刊

DOI:10.11931/guihaia.gxzw201803012

‘宁杞 8 号’体细胞胚胎发生体系建立

刘静[1,2]，袁婷[2]，倪细炉[1,2]，朱强[1,2]，王翠平[1,2]

(1.宁夏林业研究院股份有限公司，银川 750004；2.种苗生物工程国家重点实验室，银川 750004)

摘　要：以宁夏枸杞新品种‘宁杞 8 号’幼嫩叶片为外植体，探讨激素组合及添加物对‘宁杞 8 号’体细胞胚胎诱导、体胚增殖、萌发和植株再生的影响，建立高效稳定的体细胞胚胎发生体系。结果表明:通过对 6-BA、2,4-D 和 IAA 进行正交分析，筛选出‘宁杞 8 号’体细胞胚诱导最优激素组合：6-BA 1.0 mg·L^{-1}+2,4-D 0.3 mg·L^{-1} + IAA 0.4 mg·L^{-1}，体胚诱导率达 88.67%。极差分析比较各激素间的影响，6-BA 对体胚诱导影响最显著。当高浓度的生长素及低浓度细胞分裂素浓度适宜的配比时，才能诱导产生形态正常数量多的‘宁杞 8 号’体细胞胚。在体胚增殖培养中，6-BA 的浓度过高易导致玻璃化，不利于‘宁杞 8 号’体胚增殖生长。随着激素浓度的增高，体胚增殖倍数增加，但玻璃化率也越高，综合分析得到‘宁杞 8 号’最佳体胚增殖培养 6-BA 0.4 mg·L^{-1}+NAA 0.6 mg·L^{-1}。当添加 IBA 0.3 mg·L^{-1}+GA_3 0.4 mg·L^{-1}+蔗糖 10 g·L^{-1} 时，‘宁杞 8 号’体胚萌发率最高,萌发率达 89.17%。在添加 GA_3 及低浓度蔗糖条件下，能促进成熟的体胚萌发。对‘宁杞 8 号’体萌发的影响程度依次是 IBA> 蔗糖 > GA_3。活性炭能有效提高‘宁杞 8 号’体胚再生植株率，同时对萌发体胚的根的发育也有促进作用，当 IBA 0.1 mg·L^{-1}+KT 0.4 mg·L^{-1}+活性炭 1 g·L^{-1} 时，‘宁杞 8 号’体胚再生植株效果最佳，体胚再生率达 91.67%。

关键词：‘宁杞 8 号’，体细胞胚胎发生，体胚诱导增殖，体胚萌发，植株再生

中图分类号：Q943.1　　　　**文献标志码：**A

Establishment of somatic embryogenesis system of *Lycium barbarum* ‘Ningqi 8’

LIU Jing[1,2], YUAN Ting[2], NI Xilu[1,2], ZHU Qiang[1,2], WANG Cuiping[1,2]

(1. *Ningxia Forestry Institute Co., Ltd*, Yinchuan 750004, China；2. *State Key Laboratory of the Seedling Bioengineering* , Yinchuan 750004, China)

Abstract: In order to establish a high-frequency regeneration system for *Lycium barbarum*. The leaf of *Lycium barbarum* ‘Ningqi 8’ was selected as materials, to explore the crucial effects of hormone combinations and additives on the induction of somatic embryogenesis, germination and regeneration. The results showed that By orthogonal analysis of 6-BA, 2,4-D and IAA, the optimal hormone combination of ‘Ningqi 8’ somatic embryos was 6-BA 1.0 mg·L^{-1}+2,4-D 0.3 mg·L^{-1}+IAA 0.4 mg·L^{-1}, the highest induction rate could get to 88.67%. Range analysis showed that 6-BA had the most significant effect on somatic embryogenesis. Using suitable proportion of hormone combination was possible to induce somatic embryogenesis of ‘Ningqi 8’, which had a large number of normal morphology. In the culture of somatic embryos, the high concentration of 6-BA was easy to cause

基金项目：国家自然科学基金(31701878)；宁夏自然科学基金(NZ16216)[Supported by the National Natural Science Foundation of China(31701878)；Natural Science Foundation of Ningxia(NZ16216)]。

作者简介：刘静（1989-），女，宁夏银川人，硕士，研究实习员，主要从事生物技术研究工作，(E-mail) 1137416502@qq.com

chinaXiv:201808.00131v1

vitrification, which was not conducive to the growth and proliferation of ‘Ningqi 8’ somatic embryos. The proliferation rate of somatic embryos increased with the increase of hormone concentration, but the vitrification rate increased too. Then the most efficient proliferation medium for ‘Ningqi 8’ was 6-BA 0.4 $mg\cdot L^{-1}$+NAA 0.6 $mg\cdot L^{-1}$, and the highest germination rate of ‘Ningqi 8’ somatic embryo was obtained when IBA 0.3 $mg\cdot L^{-1}$+GA_3 0.4 $mg\cdot L^{-1}$+ sucrose 10$g\cdot L^{-1}$ was added. The highest germination rate could get to 89.17%, and the degree of influence on the germination of ‘Ningqi 8’ was IBA > sucrose > GA_3. Under the condition of adding GA_3 and low concentration sucrose could promote the mature somatic embryos germination. Activated carbon could effectively improve the regeneration rate of ‘Ningqi 8’ somatic embryo, and simultaneously promote the development of the root of germination embryo. The IBA 0.1 $mg\cdot L^{-1}$+KT 0.4 $mg\cdot L^{-1}$+ activated carbon 1$g\cdot L^{-1}$ was found to be suitable medium for regeneration in which ‘Ningqi 8’ demonstrated a highest multiplying capacity, and the regeneration rate could get to 91.67%. The research provides a new avenue for the improvement of *Lycium barbarum* varieties and breeding of new varieties.

Key words: ‘Ningqi 8’, somatic embryogenesis , induction and proliferation, somatic embryo germination, plant regeneration

chinaXiv:201808.00131v1

宁夏枸杞（*Lycium barbarum*）属于茄科枸杞属，多年生分枝灌木，具有很高的药用价值和生态价值。随着宁夏枸杞药用保健方面的深入发掘，种植面积逐年增加，用途单一的枸杞品种很难满足加工企业的需求，要培育用途广泛的枸杞新品种，以满足生产加工的需要（何军等，2006）。杂交育种是运用最早且最为常规的育种手段，但其新品种育种年限长。而生物技术与常规育种相结合，为宁夏枸杞新品种选育提供了新的技术手段。枸杞生物育种技术始于 20 世纪 80 年代初，其研究内容已涉及到植物细胞工程的方面，如:优良品种的快速繁殖技术、种胚离体培养技术，原生质体培养技术，单倍体、多倍体育种等（任贤等，2007）。植物体细胞胚具有单细胞起源、繁殖速度快、体胚个体间遗传背景一致、染色体稳定等特点，是开展植物细胞工程育种中遗传转化、种质保存、人工种子等研究工作的关键环节，也是悬浮细胞系建立、细胞突变体诱导与筛选、原生质体培养与融合等诸多生物技术应用的基础。枸杞体细胞胚胎发生体系的建立将为宁夏枸杞生物技术育种提供了良好的平台，同时有助于加快生物技术在宁夏枸杞品种改良方面的应用。

曹有龙等（1997）以‘宁杞 1 号’髓部组织为材料，通过悬浮培养诱导胚状体发生。马和平等（2005）对‘宁杞 2 号’幼果未成熟胚进行体细胞胚胎诱导，探讨了激素、光照及温度对体胚发生及植株再生的影响。王兆宾等（2014）以‘宁杞 1 号’、‘宁杞 2 号’、‘宁杞 4 号’及新疆枸杞种子为外植体，构建了体细胞胚高频发生再生体系。这些报道为枸杞体细胞发生体系的建立提供了借鉴。然而由于基因型的差异，体细胞胚发生体系建立的最优条件在枸杞不同品种间存在较大差异。‘宁杞 8 号’是通过自然选优的方式获得的大果宁夏枸杞新品种，具有生长旺盛、果粒大、果实营养成分高等优良特性(南雄雄等，2014)。‘宁杞 8 号’单个果实纵径可达 4.3cm，是‘宁杞 1 号’等品种的两倍，然而，目前有关‘宁杞 8 号’体胚发生的相关研究未见报道。‘宁杞 8 号’体细胞胚胎发生体系的建立，为枸杞品种改良和新品种选育提供新途径，不受时间和空间的限制，同时，短时间大量繁殖，加快优良品种的繁育，满足新品种工厂化生产。

激素在体胚诱导过程中都起到了重要作用，2,4-D 多用于外植体脱分化方面，而且诱导脱分化后还必须及时降低或去掉 2,4-D 后，胚性细胞才能正常发育（Merkle，2000）。IBA、KT 等激素的混合主要用于促进体胚的成熟。GA_3 在许多植物的体胚诱导方面没有明显影响，但对体胚成熟有较明显的促进。活性炭有吸附细胞培养过程中产生的有毒代谢废物的功能，可促进体胚的分化和发育。不同激素在体胚发生过程

ChinaXiv合作期刊

中起到不同的作用，不同外植体对不同激素的要求水平也不相同，只有在各种激素组合适当的时候才能促进体胚发生。国内更多研究是以枸杞胚乳、种子、子叶及下胚轴等为外植体进行体胚诱导，对于叶片诱导研究较少。利用枸杞叶片进行体胚诱导取材更为方便，还能较大的保存植株的遗传特性。本研究以宁夏枸杞新品种‘宁杞 8 号’叶片为外植体，探索不同种类及浓度的附加物对体细胞胚胎发生的影响，旨在建立体细胞胚胎发生体系，也为宁夏枸杞生物技术育种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

本试验外植体材料为宁夏枸杞新品种‘宁杞 8 号’顶稍幼嫩叶片，采自宁夏林业研究院枸杞种质资源圃。该品种于 2012 年通过国家植物新品种保护，2015 年通过宁夏自治区林木良种审定。

1.2 方法

1.2.1‘宁杞 8 号’体细胞胚诱导

采取健壮无病虫害的‘宁杞 8 号’的幼嫩叶片，自来水冲洗 30 min，在超净工作台上，先用 75%酒精处理 30 s，无菌水冲洗 3～4 遍。再用 0.1%的 $HgCl_2$ 溶液处理 3～4 min，无菌水冲洗 3～4 次后，将叶片剪成 0.5 cm×0.5 cm 的小块，接种于诱导培养基中。

采用 $L_9(3^4)$ 正交设计，研究 6-BA（0.5、1.0、1.5 mg·L^{-1}）、2,4-D（0.3、0.6、0.9 mg·L^{-1}）、IAA（0.2、0.4、0.6 mg·L^{-1}）对‘宁杞 8 号’体细胞胚胎诱导的影响，共 9 个处理，基本培养基：MS 培养基+蔗糖 30 g·L^{-1}+琼脂 6 g·L^{-1}。每处理 10 瓶，每瓶 5 个外植体，每处理重复 3 次。培养 40 d 后，统计体胚诱导率及体胚的生长情况。培养温度 23～25 ℃，光照 16 h·d^{-1}，光照强度 2 000 lx，培养方式下同。

1.2.2 ‘宁杞 8 号’体胚增殖培养

采用二因素完全随机试验设计，探究 6-BA（0.4、0.8 mg·L^{-1}）和 NAA（0.2、0.4、0.6 mg·L^{-1}）对‘宁杞 8 号’体胚增殖的影响，共设 6 个处理，基本培养基：MS 培养基+蔗糖 30 g·L^{-1}+琼脂 6 g·L^{-1}。取‘宁杞 8 号’生长正常的体胚组织块，切成 0.2 cm×0.3 cm 小块接种于上述体胚增殖试验培养基内。每处理 10 瓶，每瓶 5 个体胚块，重复 3 次。培养 40 d 后统计增体胚再生率和增殖倍数。

1.2.3 ‘宁杞 8 号’体细胞胚萌发

研究 IBA、GA_3、蔗糖对‘宁杞 8 号’体胚萌发的影响，采用 $L_9(3^4)$正交设计：A.IBA 浓度(0.1、0.2、0.3 mg·L^{-1})、B.GA_3浓度(0.2、0.4、0.6 mg·L^{-1})、C.蔗糖（10、20、30 g·L^{-1}），MS 为基本培养基。将成熟体胚分别接种上述试验处理中，每处理 10 瓶，每瓶 4 个成熟体胚，重复 3 次。培养 30 d 后，统计体胚萌发率，记录体胚萌发生长状况。

1.2.4‘宁杞 8 号’体胚完整植株再生

添加 0.1、0.3 mg·L^{-1} 的 IBA 和 0.2、0.4 mg·L^{-1} 的 KT，同时又分：①不添加活性炭和②添加 1 g·L^{-1} 活性炭两组，总共设 8 个处理（见表 4），基本培养基：MS 培养基+蔗糖 30 g·L^{-1}+琼脂 6 g·L^{-1}。将长有胚根的体胚接种于上述培养基中，每处理 10 瓶，每瓶 4 个材料，重复 3 次，培养 25 d 后，记录植株再生率、植株的生长情况及芽增殖系数。

1.2.5 数据处理与统计

chinaXiv:201808.00131v1

体胚诱导率(%)=生成体胚叶片数/接种的叶片总数×100%

体胚增殖倍数=叶片体胚团产生新的体胚数/该处理接种的体胚数

体胚玻璃化率(%)=新增殖体胚中的玻璃化体胚数 / 供试体胚总数×100%

体胚萌发率(%)＝生根的体胚数 / 供萌发试验的体胚总数×100%

再生植株率(%)＝根芽完整的植株 / 供试的体胚总数×100%

芽增殖系数=体胚产生的芽数/供试接种数

用 DPS 数据处理系统进行数据分析，Duncan's 检验显著性。

2 结果与分析

2.1 激素对'宁杞 8 号'体细胞胚胎诱导的影响

根据表 1 中 K 值的大小，通过 6-BA、KT、NAA 各因素水平间的比较，6-BA 在 1.0 mg L^{-1} 时为最优，2,4-D 在 0.3 mg L^{-1} 时为最优，IAA 在 0.4 mg L^{-1} 时为最优，可得出'宁杞 8 号'体细胞胚诱导最优激素组合 6-BA 1.0 mg L^{-1}+2,4-D 0.3 mg L^{-1} + IAA 0.4 mg L^{-1}，即处理 4。处理 4 体胚诱导率最高，达到了 88.67%，说明处理 4 对诱导体胚发生效果最好，这一结果与 K 值分析结果一致。综合以上分析结果，可以确定'宁杞 8 号'体细胞胚诱导最佳组合为 6-BA 1.0 mg L^{-1}+2,4-D 0.3 mg L^{-1}+IAA 0.4 mg L^{-1}。极差值 R 越大，说明该因素对指标的影响越显著，从表中可以看出，6-BA 的 R 值最大，说明在本试验中 6-BA 为主导因素，对'宁杞 8 号'体细胞胚诱的影响最大，在这三个因素中，根据 R 值的大小，对'宁杞 8 号'体细胞胚诱导的影响程度依次是 6-BA > IAA >2,4-D。

表 1 '宁杞 8 号'体胚诱导率正交设计结果分析表

Table1 Results of orthogonal test on the induction rates of 'Ningqi 8'somatic embryos

试验号 Text No.	6-BA (mg L^{-1})	2,4-D (mg L^{-1})	IAA (mg L^{-1})	体胚诱导率 Rate of somatic embryo (%)
1	0.5	0.3	0.2	40.00efFG
2	0.5	0.6	0.4	61.33cCD
3	0.5	0.9	0.6	36.67fG
4	1.0	0.3	0.4	88.67aA
5	1.0	0.6	0.6	72.00bBC
6	1.0	0.9	0.2	80.67abAB
7	1.5	0.3	0.6	55.33cdDE
8	1.5	0.6	0.2	33.33fG
9	1.5	0.9	0.4	48.67deEF
K1	46.00	80.44	45.78	—
K2	61.33	55.56	55.33	—
K3	51.33	66.22	54.67	—
R	34.67	6.00	14.89	—

注:同列不同小写字母表示 *P*=0.05 水平差异显著，不同大写字母表示 *P*=0.01 水平差异显著。K 为每个因素下对应水平结果的和，R 为极差值。下同。

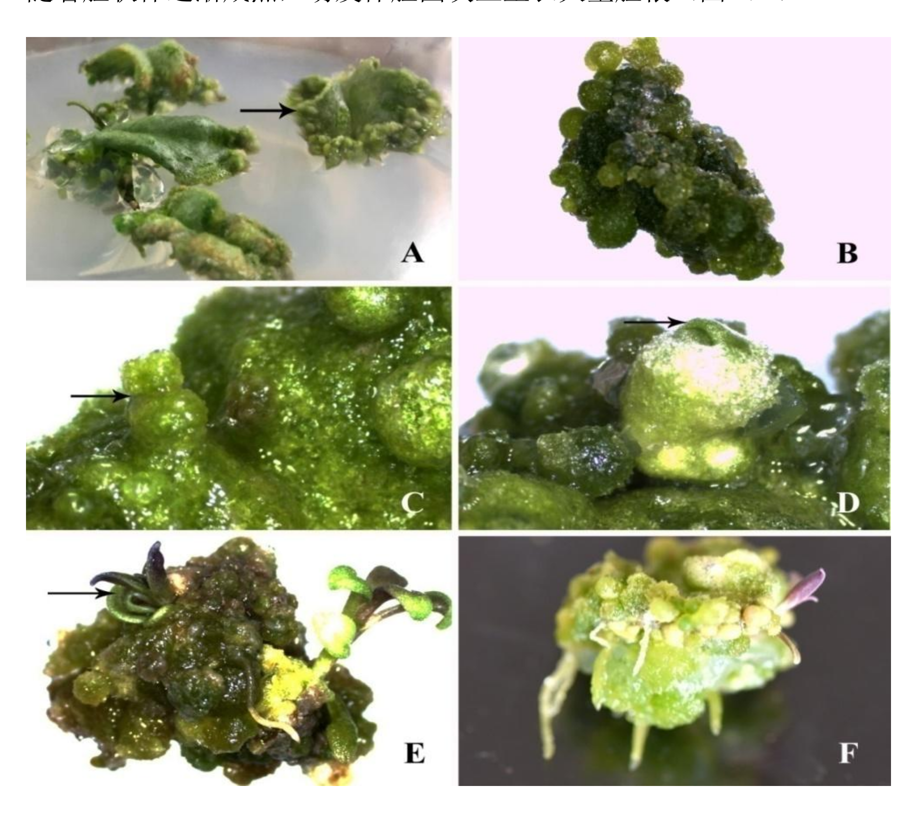
Note: Different lowercase letters mean significance difference at *P*=0.05 level, different capital letters mean significance difference at *P*=0.01 level. K is the sum of the corresponding level results of each factor, and R is the extreme value. The same below.

2.2'宁杞 8 号'体胚发育不同阶段形态观察

'宁杞 8 号'体胚诱导培养过程中，10 d 后叶片逐渐膨大，叶面拱起。15 d 膨大的叶片切口处生成许多密集小突起，呈现绿色球形小点（图 1: A）。培养 20 d 后，逐渐生成细胞团，呈不规则形态。培养 25 d 后，

chinaXiv:201808.00131v1

细胞团不断增殖，包围整个胚体。通过显微观察发现，清晰可见许多发育良好的球形胚（图 1：B）、心形胚（图 1：C）和鱼雷胚（图 1：D）。球形胚因形态较大，肉眼可见。随着发育程度的变化，同一体胚团块能观察到各个时期的体胚同时存在，以球形胚居多，可见鱼雷胚和发育较快的子叶胚，并有绿色或紫红色芽出现（图 1: E)。随着胚状体逐渐成熟，萌发体胚团块上生长大量胚根（图 1: F)。



注：**A.** 切口处密集小突起(箭头指示)；**B.** 球形胚；**C.** 心形胚(箭头指示)；**D.** 鱼雷胚(箭头指示)；**E.** 发育较快的绿色或紫红色子叶期(箭头指示)；**F.** 萌发体胚团块。

Note: **A.** Many protrusions at the blade notch(Follow the arrow); **B.** Globular embryo; **C.** Heart-shaped embryo(Follow the arrow); **D.** Torpedo-shaped embryo(Follow the arrow); **E.** Fast growing green or purple red cotyledon Phase(Follow the arrow); **F.** The somatic embryo mass of germination.

图 1 体胚发育不同阶段形态观察

Fig.1 Morphological observation on different stages of somatic embryogenesis

chinaXiv:201808.00131v1

2.3 6-BA 和 NAA 对‘宁杞 8 号’体胚增殖的影响

由表 2 可以看出，当 6-BA 浓度不变时，随着 NAA 浓度的升高，体胚增殖倍数逐渐增加，在处理 6 中 6-BA 为 0.8 mg Ł$^{-1}$，NAA 为 0.6 mg Ł$^{-1}$ 时，体胚增殖倍数最高，达到 13.22，但其玻璃化率也最高。在体胚增殖培养中，不是激素浓度越高越好，6-BA 的浓度过高易导致玻璃化，不利于‘宁杞 8 号’体胚增殖生长。当降低 6-BA 浓度为 0.6 mg Ł$^{-1}$ 时，即处理 3，体胚增殖倍数为 12.28，在 P=0.05 水平下与处理 6 差异不显著，体胚玻璃化率明显低于处理 6，差异显著，且处理 3 体胚玻璃化率与处理 1、2 差异不显著。因此，综合分析可得，最优‘宁杞 8 号’体胚增殖的配方为 6-BA 0.4 mg Ł$^{-1}$+NAA 0.6 mg Ł$^{-1}$，即处理 3。

表 2 不同浓度 6-BA、NAA 对‘宁杞 8 号’体胚增殖的影响

Table 2 Effects of 6-BA and NAA concentrations on proliferation of ‘Ningqi 8’ somatic embryos

处理编号 Treatment No.	6-BA (mg Ł$^{-1}$)	NAA (mg Ł$^{-1}$)	体胚增殖倍数 Multiplication rate of somatic embryos	体胚玻璃化率 Vitrification rate of somatic embryos (%)	体胚增殖量 Volume of somatic embryogenesis
1	0.4	0.2	7.80cD	9.53cC	+
2		0.4	9.93bCD	11.33cC	++

3		0.6	12.28aAB	12.80cC	+++
4		0.2	8.60bcCD	20.67bB	+
5	0.8	0.4	10.17bBC	24.73bB	++
6		0.6	13.22aA	34.27aA	+++

注："+"表示体胚团块大小 0.5 cm ×0.5 cm～0.7 cm ×0.7 cm；"++" 表示体胚团块大小 0.7 cm ×0.7 cm～0.9 cm ×0.9 cm；"+++"表示体胚团块大小 0.9 cm ×0.9 cm～1.0 cm ×1.0 cm。
Note: '+'means the size of somatic embryos 0.5 cm ×0.5 cm to 0.7 ×0.7 cm; '++'means the size of somatic embryos 0.7 ×0.7 cm to 0.9 cm ×0.9 cm; '+++' means the size of somatic embryos of 0.9 cm×0.9 cm to 1.0 cm×1.0 cm.

2.4 激素和蔗糖对'宁杞 8 号'体胚萌发的影响

'宁杞 8 号'体胚萌发统计结果见表 3，8 号处理体胚萌发率最高，达 89.17%，体胚萌发效果最佳，且差异显著。从表中 k 值的大小可知，IBA 在 0.3 mg L^{-1} 时，GA_3 在 0.4 mg L^{-1} 时，蔗糖在 10 g L^{-1} 时为最优，可得出'宁杞 8 号'体胚萌发最优激素组合为 IBA 0.3 mg L^{-1}+GA_3 0.4 mg L^{-1}+蔗糖 10 g L^{-1},即处理 8，与试验数据所得结果一致，可确定该组合是'宁杞 8 号'体胚萌发最佳激素配方。IBA 的 R 值最大，说明'宁杞 8 号'体胚萌发中 IBA 为主导因素，对'宁杞 8 号'体胚萌发的影响最大。根据 R 值的大小，对'宁杞 8 号'体萌发的影响程度依次是 IBA> 蔗糖> GA_3。

表 3 '宁杞 8 号'体胚萌发率正交设计结果分析表
Table3 Results of orthogonal test on the percentage of germination of 'Ningqi 8' Somatic embryos

处理编号 Treatment No.	A IBA (mg L^{-1})	B GA_3 (mg L^{-1})	C 蔗糖 Sucrose (g L^{-1})	体胚萌发率 Germination percentage of somatic embryos (%)
1	0.1	0.2	10	50.00dDE
2	0.1	0.4	20	42.50deEF
3	0.1	0.6	30	39.17eF
4	0.2	0.2	20	58.33cCD
5	0.2	0.4	30	44.17deEF
6	0.2	0.6	10	65.83bcBC
7	0.3	0.2	30	59.17cCD
8	0.3	0.4	10	89.17aA
9	0.3	0.6	20	72.50bB
K1	43.89	56.11	73.61	—
K2	55.83	58.61	59.17	—
K3	68.33	57.78	47.50	—
R	29.72	3.33	20.83	—

2.5 激素及活性炭对'宁杞 8 号'体胚植株再生的影响

根据表 4 分析可知，添加活性炭对'宁杞 8 号'体胚植株再生有显著效果，植株再生率、新生根数、根长及芽增殖系数添加活性炭的处理组都高于未添加活性炭的处理组，说明添加活性炭有利于'宁杞 8 号'体胚植株再生。在 IBA 0.1 mg L^{-1} 的浓度处理下，KT 0.4 mg L^{-1} 处理对'宁杞 8 号'体胚植株再生的效果要优于 KT 0.2 mg L^{-1} 处理，当提高 IBA 浓度，为 0.3 mg L^{-1} 时，KT 0.2 mg L^{-1} 处理效果优于 KT 0.4 mg L^{-1} 处理，说明生长素和细胞分裂素在一定的比例配比下，更有利于'宁杞 8 号'体胚植株再生，不是配比越高生长情况越好。综上所述，IBA 0.1 mg L^{-1}+KT 0.4 mg L^{-1}+活性炭 1 g L^{-1} 为'宁杞 8 号'体胚植株再生最优组合，即处理 4，植株再生率最高达 91.67%。

表 4 不同激素及活性炭对'宁杞 8 号'体胚植株再生的影响
Table 4 Effects of different hormones and activated carbon on the plant regeneration of 'Ningqi 8' somatic embryos

chinaXiv:201808.00131v1

处理 Treatment (mg·L^{-1})		芽增殖系数 Shoot proliferation rate of plantlets	植株再生率 Rate of plant regenerate (%)	平均新生根数 Average number of new roots	平均新生根 Mean new root length(cm)
IBA0.1+KT0.2	1 ①	2.14eEF	52.50eE	5.25eF	4.31fF
	2 ②	3.11cCD	78.33bcB	7.20bB	5.61bB
IBA0.1+KT0.4	3 ①	2.36deEF	57.50eDE	5.69eEF	5.04dD
	4 ②	4.45aA	91.67aA	7.68aA	6.27aA
IBA0.3+KT0.2	5 ①	2.67dDE	75.83cBC	6.19dDe	4.69eE
	6 ②	3.35bdBC	85.00abAB	7.02bcBC	5.22cdCD
IBA0.3+KT0.4	7 ①	2.02eF	66.67dCD	4.56fG	4.10fF
	8 ②	3.73bB	80.83bCB	6.64cdCD	5.49bcBC

注：①不添加活性炭；②添加 1 g·L^{-1} 活性炭。
Note：①Not adding activated carbon；②Adding 1 g·L^{-1} activated carbon.

3 讨论与结论

在植物体细胞胚胎发生过程中，植物生长调节剂是诱导体细胞胚胎发生最活跃的因子，体胚发生不同阶段所需植物生长调节剂种类和浓度存在差异。本研究结果表明，当高浓度的生长素及低浓度细胞分裂素浓度适宜的配比时，才能诱导产生形态正常数量多的‘宁杞 8 号’体细胞胚。当 6-BA 1.0 mg·L^{-1}+2,4-D 0.3 mg·L^{-1}+IAA 0.4 mg·L^{-1} 时，‘宁杞 8 号’体胚诱导率最高，达 88.67%，诱导效果最佳，但 6-BA 浓度过高，反而抑制了体胚的生成。对‘宁杞 8 号’体细胞胚诱导各激素效应由大到小依次为 6-BA> IAA >2,4-D，其中 6-BA 的影响最显著。张新宁等（1996）研究也有与本研究相同的发现，枸杞幼胚接种在含 6-BA0.5～1.0 mg·L^{-1} 和 IAA 0.5 mg·L^{-1} 两种激素的培养基上进行培养，幼胚胚性愈伤组织的发生率最高。罗青等（2016）通过对枸杞花药进行培养试验指出 6-BA 和 NAA 配合使用，胚性愈伤组织分化频率最高，与本研究结果相比较，在激素种类，浓度选择上有着相似的地方。大多数植物细胞在离体培养条件下诱导胚性细胞的发生必须在含有 2,4-D 的条件下，并认为 2,4-D 对内源生长素的调节和平衡起重要作用（张涛，2007）。张波等（2016）研究中指出，枸杞花药在 2,4-D 0.2 mg·L^{-1} 体胚诱导效果最佳。这和本研究添加 2,4-D 0.3 mg·L^{-1} 体胚诱导效果最佳结果相似，但由于品种和外植体种类的不同，2,4-D 最适宜浓度略有不同。枸杞体胚诱导材料主要有胚乳、种子、子叶、花药、花粉及下胚轴等，本实验以枸杞叶片为外植体，与以往枸杞体胚诱导方式相比取材更为方便，数量也比较多，可以随时采集，在本实验筛选的最适宜三种激素配比下，枸杞体细胞胚诱导率远高于胚乳、种子、子叶、花药、花粉及下胚轴等材料体胚诱导率。

体细胞胚通过增殖，能获得大量形态正常的体胚，为体胚萌发及植株再生研究提供材料。通过 6-BA 和 NAA 配比对‘宁杞 8 号’体胚增殖倍数影响进行研究，当 6-BA 浓度达到 0.8 mg·L^{-1}，NAA 0.6 mg·L^{-1} 时，体胚增殖能力最强，但玻璃化率也最高，当 6-BA 0.4 mg·L^{-1}，NAA 0.6 mg·L^{-1} 时，体胚增殖能力较强，玻璃化率明显降低。综合分析得到 6-BA 0.4 mg·L^{-1}+ NAA 0.6 mg·L^{-1} 为最优‘宁杞 8 号’体胚增殖培养基。潘珺等（2018）在抗性赤松体胚增殖条件优化研究中发现，添加适宜浓度的 NAA 和 6-BA 能够有效的提高体胚增殖速度，对抗性赤松体胚增殖影响显著，这与本研究的结果一致。在‘宁杞 8 号’体胚增殖过程中，各处理都出现了玻璃化现象，‘宁杞 8 号’体胚增殖玻璃化控制还需进一步研究。此外，本研究所取增殖的外植体为体胚发育的各个时期，具体‘宁杞 8 号’体胚哪个发育时期更有利于体胚增殖也有待进一步的研究。

chinaXiv:201808.00131v1

ChinaXiv合作期刊

体胚的成熟、萌发和转化是一种相互依赖的关系。成熟是萌发和转化的基础,只有形态和生理上都成熟的体胚才能顺利进行随后的萌发和转化。GA_3在体细胞胚进一步的发育成熟、刺激胚根生长和形成完整小植株中起重要的作用（Ammirato，1983）。低浓度蔗糖，胚性愈伤停留在组织阶段，球形胚甚少，但愈伤组织量多，再生能力强，而且正常苗比例高（Abdoulaye，2006）。蒋菁等（2013）通过研究发现，成苗培养基中添加GA_3利于促进体细胞胚诱导成苗，GA_3对花生的体胚萌发与植株再生有促进作用。赵苹静（2009）研究中同样也指出在添加GA_3及低蔗糖浓度条件下，能促进成熟的体胚萌发。本研究通过对IBA、蔗糖和GA_3进行三因素三水平的正交试验，筛选出‘宁杞8号’体胚萌发最优激素组合为IBA 0.3 mg·L^{-1}+GA_3 0.4 mg·L^{-1}+蔗糖10 g·L^{-1}，其体胚萌发率高达89.17%，与上述观点一致。培养基中添加活性炭有利于体胚的成熟发育（王丽，2016）。本研究结果也表明，在‘宁杞8号’植株再生培养基中添加适量活性炭，能有效提高体胚萌发后再生植株率，活性炭对萌发体胚的根的发育也有促进作用。IBA 0.1 mg·L^{-1}+KT 0.4 mg·L^{-1}+活性炭1 g·L^{-1}为‘宁杞8号’体胚植株再生最优组合。王晓春等（2004）在大豆体细胞胚研究中也同样得出，添加适量的活性碳促进体胚萌发成正常苗，且促进根系生长，幼苗健壮。活性炭能吸收培养基中组织产生的抑制胚胎发生的物质及多余的激素，通过调整激素浓度的配比而促进体胚的正常发育（袁澍等，2003）。

chinaXiv:201808.00131v1

参考文献：

Abdoulaye T, Mark J, 2006. Effects of carbon source and explants type on somatic embryogenesis of four cacao genotypes [J]. Hortic Sci, 41(3):753-758.

Ammirato PV, 1983. Embryogenesis [M]. Handbook of Plant Cell Culture: 82-113.

CAO YL, JIA YJ, LUO Q, et al, 1997. Somatic embryogenesis and plant regeneration from *Lycium barbarum* L. suspension pith cell [J]. J Ningxia Agric Coll, 18(3):47-52. [曹有龙，贾勇炯，罗青，等, 1997. 枸杞髓部细胞悬浮培养及胚状体发生[J]. 宁夏农学院学报, 18(3):47-52.]

HE J, CAO YL, LI XY, et al, 2006. On breeding of *Lycium barbarum* [J]. Shaanxi J Agric Sci, (05):68-70. [何军，曹有龙，李晓莺，等, 2006. 枸杞育种研究进展[J]. 陕西农业科学, (05):68-70.]

JIAN Q, XIONG FQ, TANG XM, et al, 2013. Effect of gibberellins light and genotype on peanut somatic embryogenesis and plantlet regeneration [J]. J Southern Agric, 44(06):903-908.[蒋菁，熊发前，唐秀梅，等, 2013. 赤霉素、光照及基因型对花生体细胞胚诱导和植株再生的影响[J]. 南方农业学报, 44(06):903-908.]

LU Q, ZHANG B, LI YL, et al, 2016. Wolfberry anther culture to obtain haploid plants [J]. Ningxia J Agric For Sci Technol,57(6):17-19.[罗青，张波，李彦龙，等, 2016. 枸杞花药离体培养获得单倍体植株[J]. 宁夏农林科技, 57(6):17-19.]

MERKLE SA, BATTLE PJ., 2000. Enhancement of embryogenic culture initia-tion from tissues of mature sweet gum trees [J]. Plant Cell Reports, 19: 268－273.

MA HP, LI Y, DI L, et al, 2005. Somatic embryogenesis of *Lycium barbarum* and plant regeneration [J]. J Gansu Agric Univ, 40(1):26-30. [马和平，李毅，邸利，等, 2005. 枸杞体细胞胚胎发生及植株再生的研究[J]. 甘肃农业大学学报, 40(1):26-30.]

NAN XX, WANG JX, CHANG HY, et al, 2014. A new variety of *Lycium barbarum* ‘Ningqi 8’[J]. Sci Silv Sin, 50(12):170. [南雄雄，王锦秀，常红宇，等, 2014. 枸杞新品种‘宁杞8号’[J]. 林业科学, 50(12):170.]

PAN J, WU XQ, XU JX, et al, 2018. Early stage observation and conditional optimization for proliferation of resistant *Pinus densiflora* somatic embryogenesis [J]. Plant Physiol J, 54(4):686-692.[潘珺，吴小芹，许建秀，等, 2018. 抗性赤松体胚发生细胞结构观察与增殖条件的优化[J]. 植物生理学报, 54(4):686-692.]

REN X, CAO JM, LIU JL, et al, 2009. Research on progress the application of wolfberry breeding [J]. Northern Hortic, (05):77-78. [任贤，曹君迈，刘建利，等, 2007. 枸杞育种技术应用研究进展[J]. 北方园艺, (05):77-78.]

WANG ZB, MA YD, ZHU Y, et al, 2014. Establishment of a high rate of somatic embryogenesis system for *Lycium barbarum* L.[J]. J Lanzhou Univ, 50(1):95-99. [王兆滨，马义德，祝英，等，2014. 枸杞体细胞胚高频发生体系的建立[J]. 兰州大学学报,

ChinaXiv合作期刊

50(1):95-100.]

WANG L, ZHANG HL, 2016. External factors affecting somatic embryos maturation plants [J]. Shaanxi For Sci and Technol, (5):73-76.[王丽，张焕玲, 2016. 植物体胚成熟发育外在影响因素研究进展[J]. 陕西林业科技, (5):73-76.]

WANG XC, LIU SQ, JI J, et al, 2004. The affect factor on the germination frequency of somatic embryos of soybean [J]. Soybean Sci, 23(2):151-154. [王晓春，刘尚前，季静，等, 2004. 影响大豆体细胞胚萌发率的因素[J]. 大豆科学, 23(2):151-154.]

YUAN S, JIA JJ, LIN HH, 2003. Several physiological factors inducing somatic embryogenesis of plant [J]. Plant Physiol J, 39(5):508-512. [袁澍，贾勇炯，林宏辉, 2003. 诱导植物体细胞胚发生的几个生理因素[J]. 植物生理学通讯, 39(5):508-512.]

ZHANG XN, SHEN XD, WANG JX, 1996. Morphological analysis and resolution of cross abortion between tetroploid and diploid of Chinese wolfberry [J]. Ningxia J Agric For Sci Technol, (4):16-18. [张新宁，沈效东，王锦秀, 1996. 枸杞四倍体同二倍体杂交败育的形态分析及解决方法[J]. 宁夏农林科技, (4):16-18.]

ZHAO PJ, 2009. Study on somatic embrygensis and callus of *Acacia podalyriifolia* [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University. [赵苹静, 2009. 珍珠相思体细胞胚胎发生及愈伤组织培养[D]. 福州市：福建农林大学.]

ZHANG T, 2007. Histological studies of somatic embryogenesis in *Eruca sativa* Mill [J]. Acta Hortic Sin, 34(1):131-134.[张涛, 2007. 芸芥体细胞胚胎发生的组织细胞学研究[J]. 园艺学报, 34(1):131-134.]

ZHANG B, LUO Q, ZHANG XY, et al, 2016. Embryoid induction of *Lyciun bararum* L. anther culture [J]. Northern Hortic, (9):105-108.[张波，罗青，张曦燕，等, 2016. 宁夏枸杞花药培养胚状体的诱导[J]. 北方园艺, (9):105-108]

chinaXiv:201808.00131v1